

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-293391
(43)Date of publication of application : 24.12.1986

(51)Int.CI. C12P 7/66

(21)Application number : 60-133031 (71)Applicant : SANKO SEISAKUSHO:KK
(22)Date of filing : 20.06.1985 (72)Inventor : KOMIYA HIDEYUKI

(54) PRODUCTION OF COENZYME Q

(57)Abstract:

PURPOSE: To extract coenzyme Q efficiently at a low cost, by extracting the coenzyme Q from dried microbial cells with hydrophilic dimethyl sulfoxide which is a hydrophilic solvent alone or in a mixture with another solvent in producing the coenzyme Q from the microbial cells.

CONSTITUTION: Microbial cells are separated from a culture fluid of coenzyme Q by centrifugation and dried. Coenzyme Q is then extracted from the dried microbial cells using dimethyl sulfoxide alone or in combination with another solvent, e.g. methyl alcohol or isopropyl alcohol, as an extracting solvent. After the coenzyme Q is extracted into the hydrophilic solvent, the coenzyme Q is transferred and dissolved in n-hexane, etc., in which the coenzyme is readily soluble, separated, dehydrated and concentrated to dryness. The resultant residue is purified by column chromatography, etc. and crystallized.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭61-293391

⑫ Int.Cl. 4

C 12 P 7/66

識別記号

厅内整理番号

A-8213-4B

⑬ 公開 昭和61年(1986)12月24日

審査請求 有 発明の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 補酵素Qの製造法

⑮ 特願 昭60-133031

⑯ 出願 昭60(1985)6月20日

⑰ 発明者 小宮 英之 平塚市高浜台1番2-401

⑱ 出願人 株式会社 三興製作所 横浜市鶴見区生麦4丁目6番29号

⑲ 代理人 弁理士 杉村 晓秀 外1名

明細書

1. 発明の名称 補酵素Qの製造方法

2. 特許請求の範囲

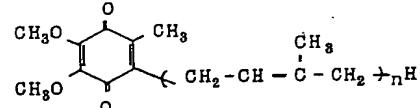
1. 補酵素Qを含有する微生物菌体から補酵素Qを抽出するにあたり、予め補酵素Qの培養液より遠心分離した菌体を乾燥し、その乾燥菌体より抽出溶媒として親水性溶媒のジメチルスルホキシド単独もしくは他の溶媒と混合して補酵素Qを抽出することを特徴とする補酵素Qの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は補酵素Qの製造方法、特に微生物菌体から高収率で補酵素Qを製造する方法に関するものである。

補酵素Qは合成により、あるいはその存在している動植物組織、微生物のミトコンドリア等から抽出により得られる。補酵素Qは下記の一般式を有するキノン誘導体である。



(ただし、式中のnは12以下の整数を示す)
補酵素Qは生体内では、呼吸酵素系の末端電子伝達系に関与し、心臓病や高血圧、悪性腫瘍などの各種疾病に対して優れた薬理効果を示す物質である。

本発明の補酵素Qとは特に補酵素Q₁₀を含有するものであり、具体的には醸酵法により生産された微生物菌体中に含有されるものである。

(従来の技術)

従来、天然物からの補酵素Qの抽出方法は、ピロガロール等の抗酸化剤の存在下、アルコール性水酸化アルカリ溶液により直接酸化した後、ヘキサン等の疏水性溶媒に転溶し、濃縮乾固後カラムクロマトグラフィー等を用いて精製する方法と、炭化水素、アセトン、エチルアルコール/エーテル(3:1)等で抽出する方法と、又は熱メチル

アルコール→熱エーテル→エーテル/メチルアルコール(3:1)若しくは熱アセトン→エチルアルコール→エーテル等で順次抽出を繰り返す方法などが採られている。

(発明が解決しようとする問題点)

従来、この方法は薬品が高価であるか、抽出設備が大型化になる欠点がある上、複雑な工程を必要とする欠点があり、この為これ等の欠点のない工業的抽出方法が要望されていた。

(問題点を解決するための手段)

本発明は前述の欠点のない工業的抽出方法を提供する。

本発明は補酵素Qを含有する微生物菌体から補酵素Qを抽出するにあたり、予め補酵素Qの培養液より遠心分離した菌体を乾燥し、その乾燥菌体より抽出溶媒としてジメチルスルホキシドを単独で又は他の溶媒と組合せて使用して補酵素Qを抽出することを特徴とする補酵素Qの製造方法である。

ジメチルスルホキシドとの混合溶媒としては、

メチルアルコール、エチルアルコール、インプロピルアルコール、n-プロピルアルコール及びアセトンから成る群から選択した親水性溶媒を用いる。特に、補酵素Qの溶解度が比較的高いインプロピルアルコールを混合した場合は使用量が少なく、抽出率も優れている。ジメチルスルホキシドは菌に対する渗透性は良く、このように混合溶媒として用いることにより優れた抽出率を得ることができる。ジメチルスルホキシドと他の溶媒との混合割合は、混合溶媒中に占めるジメチルスルホキシドの量が約10~90容積%好ましくは約40~60容積%である。抽出温度は約20~100℃であり、好ましくは約50~80℃である。抽出は30分~5時間、好ましくは約2~3時間攪拌抽出を行なう。

本発明の好適な1実施例においては、混合溶剤比1:1、温度70℃、2時間攪拌の条件下で抽出を行なう。

親水性溶媒中に補酵素Qを抽出後は、補酵素Qが易溶性であるn-ヘキサン等疏水性溶媒に攪拌により転溶させ、二層分離を行ない、n-ヘキサ

ン等の易溶性溶液層を回収し、水洗、無水硫酸ナトリウム等で脱水、濃縮乾固させる。得られた濃縮残渣をアセトンに溶解し、冷却後、不溶物を濾過により除去して、充填剤としてシリカゲル、展開剤としてn-ヘキサンを用いたカラムクロマトグラフィーで精製し、補酵素Qの分画を濃縮乾固し、残渣をエチルアルコールに溶解し、冷却下で結晶化させる。結晶化させた補酵素Qを濾別し、減圧下で乾燥する。

本発明の補酵素Qの抽出では、酸、アルカリ等の薬品を使用しない為、装置の材質の選定が容易であり、廃水処理の設備も不要である。

二層分離で分離した親水性溶媒は、濾過、蒸留等により分離精製して回収できる。従ってこれを再使用できる。

本発明において使用する乾燥菌体は、例えば次のようにして調製することができる。小量の場合は、培養した菌体を遠心分離した後、水洗し、水洗した菌体を濾別し、低温(20~40℃)で乾燥途中のものを乳鉢で粉碎しつつ乾燥する。多量の乾

燥粉を得るには、培養菌体を遠心分離し、水洗分離した後、85%程度の水分に調整したものをスプレイドライヤーで、入口温度170~200℃、出口温度(サイクロン入口温度)70~90℃で乾燥する。この条件下で操業しても補酵素Qの分解は起ららない。また乾燥菌体中の水分は約3~10重量%、例えば5~7重量%である。

以下、本発明を実施例につきさらに詳細に説明するが、本発明はこれにのみ限定されるものではない。

実施例1

補酵素Q₁₀を生産するオーレオバシディウム(Aureobasidium)sp. 14(微生物寄託番号・微研菌寄第5912号)を、尿素16.9g、KH₂PO₄60g、MgSO₄·7H₂O6g、FeCl₃·6H₂O0.18g、ジベンゾイルチアミン塩酸塩12.4mg、p-ヒドロキシ安息香酸2250ppm、微量無機塩及び水道水12lからなる培地に、エチルアルコール濃度が5000ppmになるように、制御しつつ、通気攪拌型30Lジャー・ファメンターで培養した。培養途中でKH₂PO₄、MgSO₄

特開昭61-293391 (3)

$7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、ジベンゾイルチアミン塩酸塩、微量無機塩類を適時供給し、30℃、pH5.5で6日間(144時間)培養を行ない、得たる培養液(菌体を乾燥量で3.42kgを含有)を遠心分離し、水洗分離した後、一部を85%の水分に調整し、スプレイドライヤーで乾燥した。乾燥粉体43.6g(絶乾量40g、補酵素Q₁₀含有量12.7mg)を分取りし、ジメチルスルホキシド75mlとイソプロピルアルコール75mlとの混合溶媒に投入し、70~75℃で2時間攪拌抽出を行なった。その後n-ヘキサン300mlを入れ、15分間振とうし、補酵素Q₁₀を転溶させた後静置し、2層分離を行ないn-ヘキサン層を分離した。この操作を3回行なった後、全n-ヘキサン抽出層を集め、等量の水900mlで3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。この段階での抽出液には高速液体クロマトグラフィーでの定量に妨害物質を含むので、抽出液の一部10%量を鹹化して抽出率を求めたところ93.1%であった。次に、減圧下で濃縮乾固し、残渣を小量のアセトンに溶かした後、冷却し、析出物を除去

し、減圧下で濃縮乾固した。その後シリカゲル25gを詰めたカラムクロトグラフィーにかけ、n-ヘキサンで溶出した。補酵素Q₁₀の溶出画分を減圧下で濃縮乾固し、小量のエチルアルコールに溶かして冷却すると、橙黄色の補酵素Q₁₀の結晶が析出した。エチルアルコールによりさらに2回再晶出を繰り返し、エタノール母液と分け、減圧下で乾燥し、補酵素Q₁₀の結晶9.965mgを得た(収率86.5%)。

実施例2

実施例1と同じ菌を同じ培養法で各々培養して得た菌体を遠心分離し、水洗後、40℃で途中のものを乳鉢で粉砕しながら乾燥させた。これ等の乾燥菌体を用いて、抽出培養であるジメチルスルホキシドとイソプロピルアルコールとの混合比率を変えて、次のように補酵素Q₁₀の抽出を行なった。

ジメチルスルホキシドとイソプロピルアルコールとの混合溶液に乾燥菌体を投入し、加熱下で2時間攪拌した。冷却後n-ヘキサンを300ml加え、15分振とうし、静置してn-ヘキサン層を分離し

た。この操作を3回行なった後、全n-ヘキサン抽出液を集めて等量の水で3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下で濃縮乾固した。この段階での抽出液は、高速液体クロマトグラフィーでの定量で妨害物質を含むので、鹹化を行なった後定量した。鹹化は濃縮物にピロガロール1g、水酸化ナトリウム4g、メチルアルコール30ml、水10mlを加え、90℃で1時間還流することにより行なった。急冷後n-ヘキサン100mlを加え、15分振とうし、静置してn-ヘキサン層を分離した。この操作を3回行なった。全n-ヘキサン層を集め、300mlの水で3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下で濃縮乾固した。濃縮物を小量のアセトンに溶解して、高速液体のクロマトグラフィーで定量した。これ等の結果を第1表に示す。

実施例3

実施例1と同じ菌を用いて同様にして各々培養した。但し、補酵素Q₁₀の抽出をジメチルスルホキシドとメチルアルコールとの混合溶媒を使用し、2時間攪拌抽出を行なった。以下実施例2と同様の方法で行なった。これ等の結果を第1表に示す。

2時間攪拌抽出を行なった。以下は実施例2と同様の手順で行なった。これ等の結果を第1表に示す。

実施例4

実施例1と同じ菌を用いて同様にして各々培養した。但し、補酵素Q₁₀の抽出をジメチルスルホキシドとメチルアルコールとの混合溶媒を使用し、2時間攪拌抽出を行なった。以下実施例2と同様の方法で行なった。これ等の結果を第1表に示す。

実施例5

実施例1と同じ菌を用いて培養した。但し、乾燥菌体20.6g(補酵素Q₁₀含有量14.1mg)をジメチルスルホキシド45mlとアセトン45mlとの混合溶媒に投入して、50℃にて2時間攪拌抽出を行なった。以下は実施例2と同様の方法で行なった。この際の抽出率は87.4%であった。

第 1 表

実施例	乾燥園体 (g)	抽出溶媒量 (ml)	抽出温度 (°C)	Q ₁₀ 含有量 (mg)	抽出Q ₁₀ (mg)	抽出率 (%)
2	50.1	DMSO 55 IPA 55	66 ~ 71	33.7	34.6	102.7
	46.8	DMSO 70 IPA 33	65 ~ 72	41.6	41.4	99.5
	51.1	DMSO 34 IPA 80	65 ~ 71	41.4	36.3	87.7
3	6	DMSO 50 EtOH 50	20	6.1	5.6	91.8
	10.2	DMSO 25 EtOH 25	50	11.1	8.9	80.2
4	7.9	DMSO 50 MeOH 50	55 ~ 65	5.3	5.7	107.5
	7.2	DMSO 16.5 MeOH 16.5	55	7.5	6.1	81.3

(注) DMSO=ジメチルスルホキシド、IPA=イソブロビルアルコール、
EtOH=エチルアルコール、MeOH=メチルアルコール

(発明の効果)

実施例1と第1表から明らかな通り、本発明は安価な薬品と小型の抽出設備を用いて簡単な工程で、極めて効率高く補酵素Q₁₀を抽出することができる。従って、本発明は産業上極めて有用である。

特許出願人 株式会社 三奥製作所

代理人弁理士 杉村 晓秀



同 代理人弁理士 杉村 典作

